

VU Research Portal

Fusicoccin - tool in cancer cell biology

de Vries - van Leeuwen, I.J.

2012

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

de Vries - van Leeuwen, I. J. (2012). *Fusicoccin - tool in cancer cell biology*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam]. Wohrmann print service.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

SAMENVATTING

Voor de behandeling van tumoren worden verschillende kleine organische moleculen gebruikt. Veel van deze moleculen zijn afkomstig van levende organismen. Etoposide en paclitaxel (taxol) zijn bijvoorbeeld afkomstig uit planten, terwijl doxorubicine en bleomycine zijn geïsoleerd uit bacteriën. Omdat veel tumoren resistent worden tegen de bestaande medicijnen zijn nieuwe antitumor medicijnen nog steeds nodig en hierdoor is er een grote belangstelling voor kleine moleculen met een antitumor werking. Een grote groep moleculen die nauwelijks geanalyseerd zijn behoren tot de fusicoccaa familie. Fusicoccanen bezitten een dicyclopenta[a,d]cyclooctaan skelet (5-8-5 basis ringstructuur) waar verschillende zijgroepen aan zitten. Ze worden onder andere geproduceerd door hogere planten, schimmels en zelfs dieren (insecten). Naast het beïnvloeden van verschillende biologische processen in planten hebben fusicoccanen ook een effect op dierlijke cellen. Zo beïnvloedt Ophiobolin-A (OPH-A) zoogdiercellen door de selectieve remming van calmoduline, en induceert Cotylenin-A (Cot-A) differentiatie in myeloïde leukemie cellen en heeft het een antitumor werking wanneer het gecombineerd wordt met interferon α (IFN α) of rapamycine (Rap). Een fusicoccaa nauw verwant aan Cot-A is Fusicoccine-A (FC). FC stabiliseert de eiwit/eiwit-interactie tussen het C-terminale uiteinde van de plasmamembraan H⁺-ATPase en 14-3-3 eiwitten in planten, breekt de kiemrust van zaden en remt een uitwaarts rectificerend K⁺-kanaal in gerst wortels. Verder verstoort FC ook de links/rechts orgaan asymmetrie tijdens een vroeg stadium van de *Xenopus laevis* ontwikkeling.

Omdat FC structureel nauw verwant is aan Cot-A, hebben wij het antitumor effect van FC onderzocht in **hoofdstuk 2**. Hieruit bleek dat FC het aantal levensvatbare OVCAR3 ovarium carcinoma cellen vermindert. De effectiviteit van FC kan worden verhoogd door het te combineren met IFN α (maar niet Rap) of toe te passen na een IFN α behandeling. De IFN α /FC behandeling is effectief tegen tumorcellijnen afkomstig van verschillende typen tumoren en is nauwelijks schadelijk voor gezonde HUVEC cellen (humane navelstreng endotheelcellen). FC induceert apoptose in de tumorcellen door de stimulatie van de TRAIL pathway.

De TRAIL pathway is waarschijnlijk niet het primaire FC target. Om de primaire FC receptor te identificeren en het volledige werkingsmechanisme van FC in tumorcellen op te helderen, hebben wij ons daarom gericht op wat bekend is over de FC receptor in planten. In planten stabiliseert FC de plasmamembraan H⁺-ATPase/14-3-3 interactie. Zoogdiercellen beschikken echter niet over een soortgelijke H⁺-ATPase. Daarom hebben wij een database search uitgevoerd om ionkanalen (die in planten ook door FC worden beïnvloed) en

transporters te identificeren die een C-terminale tip hebben vergelijkbaar met de plant H^+ -ATPase. Deze tip zou de binding van FC in combinatie met een 14-3-3 eiwit mogelijk moeten maken en een selectieve modulatie van een ionkanaal of transporter zou het antitumor effect van de $IFN\alpha$ /FC behandeling kunnen verklaren. Verschillende transporters en ionkanalen zijn geïdentificeerd in de database search, waarvan de meeste nieuwe potentiële targets zijn. Alleen van de TASK kanalen (TASK1 en TASK3) was al een interactie tussen hun C-terminale tip en 14-3-3 eiwitten bekend.

Voordat wij het effect van FC op de TASK kanalen hebben bestudeerd, hebben wij eerst de aanwezige ionkanalen in OVCAR3 cellen in het algemeen geanalyseerd (**hoofdstuk 3**). Hieruit bleek dat OVCAR3 cellen voornamelijk K^+ kanalen bevatten en een klein aantal Na^+ kanalen. De uitwaartse K^+ stroom wordt vergroot wanneer de extracellulaire Ca^{2+} en Mg^{2+} concentratie wordt verlaagd en vervolgens weer geblokkeerd door een verlaging van de extracellulaire pH. Deze kenmerken geven aan dat TASK kanalen (waarschijnlijk) aanwezig zijn in OVCAR3 cellen. Naast TASK kanalen moeten ook andere K^+ kanalen aanwezig zijn, omdat TASK kanalen niet de grote spannings-afhankelijke openingen hebben met een conductantie van 93 pS (± 1.7) en omdat een deel van de K^+ stroom niet gevoelig is voor een veranderingen in de extracellulaire Ca^{2+} en Mg^{2+} concentratie of pH.

In **hoofdstuk 4** hebben wij het effect van FC op TASK kanalen en de C-terminale TASK/14-3-3 interactie onderzocht. We hebben bevestigd dat alle 14-3-3 isovormen een interactie aangaan met het C-terminale uiteinde van TASK1 en TASK3 en aangetoond dat deze interactie afhankelijk is van de fosforylering van het voorlaatste serine residu. Verder versterkt FC de TASK1/14-3-3 interactie tot 7 keer voor alle 14-3-3 isovormen. Expressie analyse heeft aangetoond dat zowel TASK1 als TASK5 tot expressie komen in OVCAR3 cellen en van TASK1 kon ook het eiwit worden gedetecteerd met Western blotting. Een FC en/of $IFN\alpha$ behandeling resulteerde echter niet in een verandering van de TASK1 of TASK5 expressie. OVCAR3 cellen hebben K^+ kanalen met TASK-achtige karakteristieken, zoals beschreven in hoofdstuk 3. FC lijkt deze TASK kanalen te remmen in onbehandelde OVCAR3 cellen, terwijl FC TASK kanalen en een extra K^+ kanaal remt in $IFN\alpha$ behandelde cellen; beiden op een 14-3-3 afhankelijke manier. Wij zijn echter niet in staat geweest om deze data onomstotelijk te reproduceren en ook de identiteit van het tweede FC geremde ionkanaal in $IFN\alpha$ behandelde cellen hebben wij niet kunnen achterhalen.

Omdat wij de FC receptor verantwoordelijk voor de apoptose-inductie niet met zekerheid konden identificeren met de ionkanaal analyse, hebben wij ook een algemenere proteomics

benadering gevolgd om de FC receptor te identificeren. Hiervoor hebben wij FC gekoppeld aan magnetische beads (FC-Beads) en deze beads gebruikt voor een pull down in **hoofdstuk 5**. De FC-Beads bonden endogeen 14-3-3 selectief uit een MCF7 of OVCAR3 cellysaat en met massaspectrometrie hebben we 21 eiwitten geïdentificeerd die waren gebonden aan/geëluëerd van de FC-Beads en beschikken over een C-terminale tip die een interactie met 14-3-3 en FC mogelijk zou moeten maken. Van deze 21 eiwitten hebben we drie potentiële targets verder geanalyseerd: PMCA1 (een Ca^{2+} -ATPase, gerelateerd aan de plant H^{+} -ATPase), PABPC1 (polyadenylate-binding protein 1) en STAT1 (signal-transducer and activator of transcription 1). PABPC1 is geïdentificeerd in bijna alle humane 14-3-3 interactoom studies, alsmede in 2 onafhankelijke FC-Bead pull-downs en STAT1 speelt een belangrijke rol in IFN signalering. Voor de C-terminus van PMCA1 en de 14-3-3 isovormen konden we geen interactie aantonen middels een yeast two-hybrid assay. C-terminale peptiden van zowel PABPC1 als STAT1 interacteren wel met 14-3-3 eiwitten op een fosforylerings-afhankelijke manier in een anisotropie assay en FC verhoogt hun affiniteit. We konden echter geen interactie aantonen voor grotere C-terminale fragmenten van beide eiwitten in een yeast two-hybrid assay, maar het is ook niet bekend of deze fragmenten worden gefosforyleerd in gist. Meer experimenten zijn dan ook nodig om vast te stellen of PMCA1, PABPC1, STAT1 of een van de andere geïdentificeerde eiwitten de FC receptor is in de tumorcellen.

Bijna alle tumor cellijnen die wij geanalyseerd hebben reageren op de IFN α /FC behandeling behalve de MCF7 borsttumor cellijn, bij welke wij nauwelijks een groeireductie konden detecteren. In tegenstelling tot de MDA-MB-231 borsttumor cellijn, die wel op de IFN α /FC behandeling reageert, hebben MCF7 cellen een hoge estrogen receptor α (ER α) expressie. MCF7 cellen zijn afhankelijk van de activiteit van ER α voor hun groei en overleving en een blokkering van de ER α activiteit met anti-oestrogenen, zoals tamoxifen (TAM), is dan ook de belangrijkste therapeutische strategie die momenteel gebruikt wordt tegen ER $^{+}$ borsttumoren. In **hoofdstuk 6** hebben wij het effect van FC op de ER α bestudeerd en rapporteren een nieuw ER α regulerend mechanisme, waarbij de C-terminale tip van ER α en 14-3-3 eiwitten een belangrijke rol spelen. ER α bevat een C-terminaal mode-III 14-3-3 bindingsmotief en we hebben aangetoond dat de C-terminus een interactie aangaat met 14-3-3 eiwitten. Deze interactie wordt versterkt door ligand binding aan ER α en is afhankelijk van de fosforylering van de voorlaatste threonine van ER α , T 594 . FC verhoogt de ER α /14-3-3 affiniteit van het gefosforyleerde ER α peptide met alle 14-3-3 isovormen, behalve 14-3-3 σ .

Verder wordt het [FC/ER α /14-3-3]-complex ook gevormd met endogene MCF7 eiwitten en vermindert FC de estradiol (E2) geïnduceerde MCF7 groei. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een verminderde ER α activiteit als gevolg van de FC behandeling *in vivo*. De T⁵⁹⁴A mutatie verhoogt ook de ligand geïnduceerde ER α dimerisatie en de transcriptionele activiteit van ER α *in vivo*. Gecombineerd, resulteert deze data in een model waarbij C-terminale 14-3-3 binding aan het ER α F-domein, na T⁵⁹⁴ fosforylatie, de ER α dimerisatie voorkomt die nodig is voor een volledige activering van de receptor. Hiermee tonen wij het onderliggende mechanisme achter de rol van het C-terminale F-domein in de regulatie van ER α dimerisatie en activering aan en bieden een nieuwe behandelingsoptie met behulp van kleine liganden zoals FC die de ER α activiteit beïnvloeden door binding buiten het ligand binding domain (LBD).

Samengevat, toont dit proefschrift het belang en de potentie aan van kleine moleculen zoals FC, met betrekking tot de beïnvloeding van eiwit/eiwit-interacties en het reguleren van eiwit activiteit. Hoewel het werkingsmechanisme van FC in de diverse tumorcellen nog niet geheel duidelijk is, lijkt het selectief en celtype afhankelijk verschillende cellulaire processen en eiwit/eiwit-interacties te beïnvloeden waardoor de groei en levensvatbaarheid van tumorcellen afneemt.